

## 論文審査の結果の要旨

氏名：北中 菜菜子

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：イヌにおけるインターロイキン1 $\beta$ 誘導性細胞応答とシグナル伝達

審査委員：（主査） 教授 中山 智 宏

（副査） 教授 小川 健 司

（副査） 教授 山崎 純

炎症は、外部からの侵害刺激、細菌やウイルスなどの病原体感染、毒物成分など様々な要因に対して引き起こされる免疫系の生物学的な反応で、生体に不可欠な防御機能である。生体局所に刺激が生じると、障害部位へ血管から液性成分が浸出し、白血球も血管外へ遊走し障害部位へと移動する。このような反応の多くはケミカルメディエーターやサイトカインなどの生体物質により制御されている。

インターロイキン1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) は、免疫反応や炎症反応に関与する炎症性サイトカインであり、白血球、血管内皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞から放出される。近年、IL-1 $\beta$  の産生と放出には細胞質内タンパク質複合体のインフラマソームが関わることも明らかになりつつある。

IL-1 $\beta$  は、細胞膜受容体に結合すると、細胞に依存した細胞内シグナル伝達を介して、種々の生理活性物質の産生と放出を誘導することで様々な反応を引き起こす。IL-1 $\beta$  刺激により活性化されるシグナル伝達経路の1つがMAPキナーゼ（mitogen-activated protein kinase）経路である。MAPキナーゼは、真核生物において、細胞外からの情報を核へ伝えるシグナル伝達経路に関わる主要な酵素であり、炎症性サイトカインを含む様々な刺激に対する細胞応答に関与している。主要なMAPキナーゼ経路としては、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2、c-jun N-末端キナーゼ (JNK) および p38 の3経路が知られている。

また、転写調節因子の1つであるNF- $\kappa$ Bを介した細胞内シグナル経路もIL-1 $\beta$ 刺激により活性化される。NF- $\kappa$ Bは、特異的な細胞遺伝子の発現を増強することによって炎症反応を調節し、発がんにも関与すると考えられている。

本研究は、イヌにおける炎症制御の機序を明らかにすることで、獣医療への貢献を目的とし、イヌの細胞におけるIL-1 $\beta$ 誘導性の細胞応答と細胞内シグナル伝達経路を検討した。

### 1. イヌ皮膚由来線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ 誘導性IL-6発現

インターロイキン-6 (IL-6) は、免疫応答および炎症調節に関与するサイトカインである。本研究では、初代培養したイヌ皮膚由来線維芽細胞を用い、IL-1 $\beta$ によるIL-6発現と、それに関与するMAPキナーゼについて検討した。

培養上清中へのIL-6の放出をELISAにて測定したところ、IL-1 $\beta$ による時間および用量依存的な促進が認められた。IL-6 mRNA発現をReal-time RT-PCRで測定すると、IL-1 $\beta$ により時間および用量依存的に発現

が促進された。MAP キナーゼの関与を検討するため、細胞を MAP 阻害剤で処理をすると、ERK 阻害剤である FR180240 は、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 放出および IL-6 mRNA 発現を阻害したが、JNK 阻害剤 SP600125 および p38 阻害剤 SKF86002 による阻害効果は認められなかった。ERK を活性化する MAPK/ERK キナーゼ (MEK) の阻害剤である U0126 処理細胞においても、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 放出および IL-6 mRNA 発現は抑制された。ERK1/2 の活性化を、western blotting による ERK1/2 のリン酸化にて測定したところ、IL-1 $\beta$  は ERK1/2 リン酸化を促進した。siRNA 導入により ERK1 および ERK2 をノックダウンした細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA の発現が低下した。

これらの結果から、イヌ皮膚由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  は ERK1/2 シグナル伝達経路を介して IL-6 発現を促進し、放出を誘導することが明らかとなった。

## 2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 発現

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は正常細胞や創傷治癒などを含む病理細胞における細胞外マトリックス (ECM) 成分の分解による組織リモデリングの過程において重要な役割を担っている。本研究においては、初代培養したイヌ皮膚由来線維芽細胞を用い、IL-1 $\beta$  による MMP の一つである MMP-3 発現と、それに関わる MAP キナーゼおよび活性化転写因子-2 (ATF-2) について検討した。

イヌ皮膚由来線維芽細胞に IL-1 $\beta$  刺激を与えると、細胞上清中の MMP-3 活性が時間および用量依存的に上昇したことから、放出促進が考えられた。また、IL-1 $\beta$  刺激細胞においては、時間および用量依存的に MMP-3 mRNA 発現が促進されることが Real-time RT-PCR により認められた。ATF-2 阻害剤 SBI-0087702 で処理した細胞においては、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現の減少が認められた。IL-1 $\beta$  刺激細胞における ATF-2 のリン酸化を western blotting により検討したところ、促進が認められ、IL-1 $\beta$  誘導性の ATF-2 活性化が考えられた。siRNA 導入細胞による ATF-2 ノックダウン細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA の発現が低下した。これらの結果から、ATF-2 は IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に関与することが明らかとなった。

MAP キナーゼの関与の検討のため、ERK 阻害剤 FR180240 処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞においては IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA 発現は減弱した。siRNAs 導入により ERK1 と ERK2 をノックダウンした細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現が減少した。これらにより、IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 発現には ERK1 と ERK2 が関与していることが示された。さらに、ERK 経路と ATF-2 の関連を検討するため、ERK 阻害剤 FR180204 で細胞を処理すると、IL-1 $\beta$  誘導性の ATF-2 リン酸化は抑制された。siRNAs 導入細胞した細胞では、ERK1 ノックダウン細胞では IL-1 $\beta$  誘導性の ATF-2 のリン酸化は減少したが、ERK2 ノックダウン細胞では IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 リン酸化は認められなかった。

これらの結果から、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現には ERK1/ATF-2 経路が関与することが明らかとなった。

## 3. イヌ悪性黒色腫細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 COX-2 発現

悪性腫瘍細胞における炎症や腫瘍微小環境は、腫瘍を直接的あるいは間接的に増殖させることが知られている。プロスタグランジン E<sub>2</sub> を含むプロスタグランジン類は、腫瘍の増殖を促進する腫瘍微小環境として重要な役割を担っている。シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) は、プロスタグランジン産生の律速酵素であり、その発現制御が炎症を含む病態進行に深く関わっている。本研究では、IL-1 $\beta$  で刺激したイヌの悪性黒色腫細胞 (メラノーマ細胞) における COX-2 発現と転写調節因子の一つである NF- $\kappa$ B の関与について検討した。

イヌメラノーマ細胞を IL-1 $\beta$  で刺激し、細胞上清中のプロスタグランジン E<sub>2</sub> を ELISA にて測定すると、

時間および用量依存的にプロスタグランジン E<sub>2</sub> の放出が認められた。COX-2 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて検討すると、IL-1 $\beta$  による時間および用量依存的な COX-2 mRNA 発現の促進が認められた。NF- $\kappa$ B 阻害剤である BAY11-7082 および TPC-1 で処理した細胞においては、IL-1 $\beta$  誘導性のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出および COX-2 mRNA 発現は抑制された。NF- $\kappa$ B ファミリーである p65/RelA および p105/NF- $\kappa$ B1 のリン酸化を western blotting にて測定すると、IL-1 $\beta$  によりリン酸化は促進された。また、IL-1 $\beta$  による p65 および p105 のリン酸化は、両方の NF- $\kappa$ B 阻害剤処理をした細胞においては減弱したことから、IL-1 $\beta$  による p65 および p105 活性化が考えられた。siRNA を導入し p65 または p105 をノックダウンした細胞においては、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現は阻害された。これらのことから、イヌ悪性黒色腫細胞においては、IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B シグナル伝達の活性化を介して COX-2 発現を促進し、プロスタグランジン E<sub>2</sub> の放出が促されることが明らかとなった。

#### 4. 結論

本研究は、イヌの皮膚由来線維芽細胞および悪性黒色腫細胞を用い、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  で刺激を行い、IL-1 $\beta$  誘導性の細胞応答と細胞内シグナル伝達経路を検討し、イヌにおける炎症制御の機序を明らかにすることで、獣医療への貢献を目的としたものである。

イヌの皮膚由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  は炎症に関わる IL-6 の発現を促進した。さらに細胞内シグナル伝達経路として MAP キナーゼである ERK1/2 シグナル伝達が IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現に関与することが明らかとなった。

また、イヌの皮膚由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  は炎症に関わるマトリックスペロテアーゼ (MMP) の 1 つである MMP-3 発現を促進した。さらに、MAP キナーゼである ERK1/2 シグナル伝達が ERK1/2 を活性化し、ERK1 の下流でそれに共役する転写因子 ATF-2 の関与を明らかとなった。

一方、イヌ悪性黒色腫細胞においては、IL-1 $\beta$  により炎症時に産生されるプロスタグランジン合成の律速酵素である COX-2 の発現が促進された。その IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現には、転写調節因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達に関与することが明らかとなった。

これらの知見は、イヌの様々な炎症、腫瘍化に対するより優れた治療法、予防法の確立のために大いに役立つことが期待される。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和 2 年 2 月 21 日